



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 430**

(51) Int. Cl.:
C12N 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03725225 .1**

(86) Fecha de presentación : **23.05.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1535992**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

(54) Título: **Secuencia de nucleótidos de maíz codificante de una proteína con actividad transglutaminasa, y su uso.**

(30) Prioridad: **31.05.2002 ES 200201253**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

(72) Inventor/es: **Torné Cubiro, José María;
Santos Lozano, María Asunción;
Talavera Baró, David;
Villalobos Amador, Enrique y
Rigau Lloveras, Juan**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencia de nucleótidos de maíz codificante de una proteína con actividad transglutaminasa, y su uso.

5 Sector de la técnica

La invención se relaciona con la identificación de nuevas proteínas de origen vegetal con actividad TGasa y su uso en el campo de la manipulación, procesamiento y transformación de alimentos y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades.

10

Estado de la técnica

Las transglutaminasas (TGasa; EC2.3.2.13) (R-glutaminil-peptido-aminasa- γ -glutamyl transferasa) catalizan uniones amidas entre un grupo amino primario de una poliamina o de una lisina (donador amino) y un grupo γ -carboxiamida de un residuo glutamil de algunas proteínas (amino receptor), mediante una reacción intermedia por la que el enzima se une al sustrato por reacción entre el grupo γ -carboxiamida del residuo glutamil de la proteína y un grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína del centro activo del enzima (Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., & Beninati, S. 1995. Plant Transglutaminases. *Phytochemistry* 40:355-365). El resultado de la actividad de la TGasa es: a) la modificación de la conformación de la propia proteína y b) otros cambios de conformación más extensos como resultado de uniones entre la misma proteína y entre proteínas diferentes para formar conjugados de elevado peso molecular.

Existen estudios con TGasas en humanos, también en animales, plantas, vertebrados inferiores, algunas bacterias, algas y levaduras (Makarova, K.S., Aravind, L. & Koovin, E.V. 1999. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Science* 8:1714-1719; Bergamini, C.M., Dean, M., Tanfani, F., Ferrari, C. & Scatturin. 1999. Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase: patterns of thermal unfolding at acid and alkaline pH. *Eur. J. Biochem.* 266:575-582.; Cariello, L., Ristatore, F. & Zanitti, L. 1997. A new transglutaminase-like from ascidian *Ciona intestinalis*. *FEBS Lett* 408:171-176; Lorand, L. & Conrad, S.M. 1984. Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 58:9-35; Serafini-Fracassini, D., Del Duca S. & Beninati S. 1995. Plant Transglutaminases. *Phytochemistry* 40:355-365 ; Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Ichinose, A., Davie, EW, Kuma, K. & Miyata, T. 1993. Limulus hemocyte transglutaminase. cDNA cloning, amino acid sequence and tissue localization. *J Biol Chem* 268:262-268).

Las TGasas más conocidas son: el factor XIII de la coagulación de la sangre, que es una proteína del plasma, y la TGasa K implicada en la formación de la capa córnea de la epidermis. Por otro lado, ya han sido clonados algunos de los genes responsables de algunas de las TGasas citadas y se va conociendo la implicación de las TGasas en importantes procesos como la diferenciación celular, la estabilización de tejidos o la muerte celular programada (Ichinose, A., Bottenus, R.E. & Davie E.W. 1990. Structure of transglutaminases. *J. of Biol. Chemistry.* 265(23):13411-13414; Bergamini, C.M., Dean, M., Tanfani, F., Ferrari, C. & Scatturin. 1999. Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase: patterns of thermal unfolding at acid and alkaline pH. *Eur. J. Biochem.* 266: 575-582; Nemes, Z., Marekov, L.N. & Steinert, P.M. 1999. Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. *J. of Biol. Chemistry.* 274 (16):11013-11021). También estas enzimas parecen estar implicadas en enfermedades neurodegenerativas, tumores, enfermedades celíacas, etc, por ello son un grupo de enzimas de alto interés en los estudios clínicos. En torno a estos estudios clínicos existen diferentes patentes relacionadas con TGasas: US5,736,132 "Method of promoting adhesion between tissue surfaces" solicitada por Orthogene, Inc. 1998; US 5,726,051 "Transglutaminase gene" solicitada por Oklahoma Medical Research Foundation, 1998.

La función de las TGasas vegetales es menos conocida aunque los primeros datos sobre su existencia se publicaron hace ya unos años (Icekson I. & Apelbaun, A. 1987. Evidences for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* 84. 972-974; Serafini-Fracassini D., Del Duca S., & D'Orazi D. 1988. First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzyme activity in plants. *Plant Physiol.* 87:757). Los estudios en plantas se han centrado sobre todo en aspectos bioquímicos relacionados con la actividad, sustratos sobre los que actúa y tejidos donde abunda, pero no se ha estudiado su papel funcional en los muchos procesos en que se tienen datos parciales sobre su intervención, como son: crecimiento y desarrollo, morfogénesis en general, fotosíntesis y muerte celular (Margosiak, S.A., Drama, A., Bruce-Carver, M.R., Gonzalez, A.P. Louie, D. & Kuehn. 1990. Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiol.* 92: 88-96; Del Duca, S., Tidu, V., Bassi, R., Exposito, C., & Serafini-Fracassini, D. 1994. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 193:283-289; Del Duca, S., Della Mea, M., Muñoz de Rueda, P. & Serafini-Fracassini, D. 2000 Factors affecting transglutaminase activity catalyzing polyamine conjugation to endogenous substrates in the entire chloroplast. *Plant Physiol Biochem* 38:429-439).

Además, se ha de destacar que la transglutaminasa tiene un valor añadido para finalidades biotecnológicas. Esta nueva faceta suplementaria como metabolito de interés, proviene de su capacidad de crear uniones covalentes entre proteínas distintas. Esta propiedad se ha usado por ejemplo para mantener la textura de alimentos como pescado y carnes, reduciendo la necesidad de utilizar sales (surimi, etc). Para la formulación de gelatinas de distinta densidad etc. Para preparar cocinados con menos grasas (tofu). También es capaz de mantener la consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de un producto en diferentes temperaturas. Se usa asimismo en distintos procesados lácticos: quesos,

yogures, helados, etc. Tanto es así, que actualmente se usa como “aditivo” en muchos procesados bioalimentarios, siendo la dosis recomendada en USA para este uso de 65 ppm.

Todas estas posibilidades de la TGasa han generado la formulación de diferentes patentes sobre: métodos de obtención, utilización etc. y han hecho de esta sustancia un producto comercial como por ejemplo los que viene distribuyendo la empresa Ajinomoto, con el nombre de: Activa TG[®]. Las empresas que comercializan el producto son Ajinomoto Co. Inc de Tokio (extendida también en Norteamérica) y Rohm Enzyme de USA (www.skidmore-sales.com/whatsnew/newsletter/summer2001.pdf). Sin embargo, en España no se ha localizado ninguna empresa que se dedique a la producción industrial de TGasa.

La primera TGasa que se ha sobreexpresado para fines comerciales como los antes indicados, se realizó en bacterias (*Streptovorticillium sp.*) por la empresa Ajinomoto, quién patentó el procedimiento y las diferentes mejoras posteriores de este protocolo inicial (US5,156,956 “Transglutaminase” (1992)). Asimismo esta misma empresa tiene patentado, otro sistema similar, pero mediante la transformación de *Crassostrea gigas* (US5,736,356 “Transglutaminase originating from *Crassostrea gigas*” (1998)) y de *Bacillus subtilis* (US5,948,662 “Bacillus-derived transglutaminase” (1999)).

En los últimos años, el grupo de investigación autor de la presente invención ha realizado asimismo trabajos previos a nivel bioquímico, sobre la implicación de la TGasa en la morfogénesis de callos de maíz y su relación con la luz (Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Santos, M.A., Serafini-Fracassini, D. & Torné, J.M^a. 1999. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplast. *Plant Physiol Biochem.* 37(12):899-909). Además, recientemente se ha publicado la inmunolocalización de este enzima en distintos sistemas celulares de maíz, en relación con el desarrollo de los cloroplastos (Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. *Protoplasma.* 216:155-163). Sin embargo, no se han encontrado resultados sobre la identificación molecular y actividad funcional con transglutaminasas vegetales, por lo que es de alto interés comercial nuevos conocimientos sobre dichas transglutaminasas.

Descripción de la invención

Descripción breve

La invención se enfrenta con el problema asociado con la escasez de TGasas de origen vegetal necesarias en el campo de la manipulación y transformación de alimentos y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han identificado unas secuencias de ADN con actividad TGasa (TGasa; EC2.3.2.13) a partir del maíz. La actividad TGasa de las proteínas codificadas a partir de dichas secuencias de ADN se ha puesto de manifiesto en experimentos a partir de extractos de estas proteínas.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituyen dichas moléculas de ADN.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un vector que comprende, al menos, una de dichas moléculas de ADN.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dichas moléculas de ADN o de dichos vectores, para producir células transformadas capaces de expresar proteínas recombinantes con actividad TGasa, o para introducir dicha secuencia codificante de una proteína con actividad TGasa en células de plantas. Las células de microorganismos y las plantas transgénicas resultantes también constituyen objetos adicionales de esta invención.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye las proteínas con actividad TGasa expresadas a partir de dichas secuencias de ADN y su empleo en la manipulación y transformación de alimentos.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una molécula de ADN, en adelante molécula de ADN de la invención, proveniente de plantas y codificante de una proteína con actividad TGasa que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a),

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. NO 1 ó a la SEQ ID NO 3, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ. ID. NO: 1 ó SEQ ID NO 3. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La molécula de ADN de la invención procede de maíz y puede encontrarse en formas parecidas en otras especies de plantas superiores, entre otras: arroz, trigo, Arabidopsis, etc, donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de ADN. La molécula de ADN de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier planta que la contenga, mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de la secuencia de nucleótidos de dicha molécula de ADN, proporcionada en esta invención.

La molécula de ADN de la invención incluye los fragmentos de la misma que presentan dicha actividad GTasa.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADN de maíz de SEQ ID NO 1 ó de SEQ ID NO 3.

La molécula de ADN de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión, en adelante vector de expresión de la invención, que permite la expresión de estas proteínas con actividad TGasa en una amplia gama de células huésped. En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de ADN de la invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción del gen de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos o virus, que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Por tanto, la invención también se refiere a un vector que comprende una molécula de ADN de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma de la célula huésped.

El vector de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Kovesdi *et al.* 1997. Curr Opin Biotech 8:583-589 Transgenic Res. 10:83-103; Coffin *et al.* 1998. Retroviruses, CSHLP; Robbins *et al.* 1998. Trends Biotech. 16:35-40; Anderson. 1998. Nature 392:25-30; Schindelhauer. 1999. BioEssays 21:76-83). Un objeto particular de la presente invención lo constituye los plásmidos pGEMT15 y el pGEMT21 que contienen las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, respectivamente.

La invención también proporciona una célula que comprende una molécula de ADN o vector de expresión de la invención. Las células hospedadoras que se pueden transformar con dicho vector de expresión pueden ser, por ejemplo, células bacterianas y levaduras GRAS. Estas células que contienen el vector de expresión de la presente invención pueden ser utilizadas para la sobreproducción de las proteínas con actividad TGasa codificadas por la molécula de ADN de la presente invención. Un objeto particular de la presente invención lo constituye una proteína con actividad TGasa, entre otras, con una secuencia de aminoácidos según se describe en la SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4.

Estos resultados permiten abrir nuevas posibilidades de transformar un sistema bacteriano GRAS (Generally Recognized as Safe) o una levadura que serviría, a través de la expresión heteróloga, para producir las mencionadas nuevas proteínas TGasas. Como se ha indicado anteriormente una proteína con actividad TGasa puede ser utilizada en múltiples procesos de manipulación, procesamiento y transformación de alimentos gracias a su capacidad de crear uniones covalentes entre proteínas distintas. Esta propiedad se ha usado por ejemplo para mantener la textura de alimentos como pescado y carnes, reduciendo la necesidad de utilizar sales vease patente US5928689 “Method for treating PSE meat with transglutaminase”, WO0162888 “Improved composition of marine product”; para la formulación de gelatinas de distinta densidad; para preparar cocinados con menos grasas (tofu) vease US 6342256 “Tofu products excellent in freeze resistance and process for producing the same”, US6042851 “Process for producing packed tofu”. También es capaz de mantener la consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de un producto en diferentes temperaturas. Se usa asimismo en distintos procesados lácticos: quesos (US6270814 “Incorporation of whey into process cheese”, solicitud US20010053398 “Cheese whey protein having improved texture process for producing the same and use thereof”), yogures, helados, mayonesas, salsas y en la producción de fideos (EP0948905 “Enzyme preparations comprising transglutaminase and process for producing noodles”, US6106887 “Process for obtaining a modified cereal flour”), de chocolate (US6063408 “Process for producing chocolate”), de productos derivados a partir de patata (solicitud US20020004085 “Methods for producing potato products”), de azúcar (JP2000354498 “Production of sugar from cereal flour material by transglutaminase treatment”). Los distintos usos, entre otros, descritos en las patentes anteriores para las TGasas son ejemplos de los potenciales usos de las TGasas de la presente invención. Por lo tanto, un objeto particular de la presente invención es la utilización de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención, entre otras, las proteínas SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4, o soluciones que las contengan, en la manipula-

ción, preparación y transformación de alimentos. A continuación se indica como ejemplo de las aplicaciones de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención la revisión de Chiya Kuraishi *et al*, 2001 (Transglutaminase: Its utilization in the food industry Food Reviews International 17 (2):221-246).

5 Finalmente, existen otras aplicaciones distintas de las comentadas anteriormente de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención y de las que se indican como ilustración de dichas aplicaciones las siguientes patentes, entre otras:

10 -"Method for enzymatic treatment of wool" Patente USA. Appl. N° 161824 (1998) MacDevitt *et al*, April 2000.

-"Enzymatically protein encapsulating oil particles by complex coacervation" Appl. N° 791953 (1997). Soper, Jon C. *Et al*. March 2000.

15 -"Cross-linked gelatin gels and methods of making them" Appl. N° 641463 (1996) Bishop, P.D. *et al*. ZymoGenetics, Inc.(Seattle, WA. USA).

-"Process for obtaining a modified cereal flour" Appl. N° 977575 Ajinomoto Co. Inc (Tokyo JP). Yamazaki *et al*. August 2000.

20 -"Microbial transglutaminase, their production and use" Appl. N° 294565, (1999). NovoNordisk A/S (Bagsvaerd, DK) Bech *et al*. Feb. 2001.

Además, la molécula de ADN o vector de expresión de la invención pueden emplearse en procedimientos de transformación genética de plantas con finalidades tanto de investigación fundamental y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades provocadas por la manipulación de las funciones atribuidas a dicha TGasa (crecimiento y desarrollo de la planta, morfogénesis, fotosíntesis y muerte celular) mediante la alteración de la expresión de dichas proteínas.

30 Descripción de las figuras

Figura 1.- Actividad TGasa (medida en pmol de Put incorporada) de un extracto proteico correspondiente a cada uno de los productos de lisis fágica descrito en el apartado de metodología, correspondientes a los fagos positivos f1 y f2 (que contienen un distinto cDNA de TGasa de maíz: f1 = SEQ 1D NO 1 y f2 = SEQ 1D NO 3) y al fago negativo f3 (que no contiene ningún cDNA de TGasa). Además, se muestra el efecto de distintos factores que influyen sobre la actividad TGasa de los extractos, descritos como propios de dicha actividad enzimática TGasa en otros sistemas: *Calcio* = el extracto proteico y en ausencia de calcio. *GTP* = adición de 1 mM de GTP. *MDC* = adición de 1 mM de MDC.

40 Figura 2.- Actividad de los dos extractos proteicos correspondientes a los dos fagos independientes que contienen los dos cDNA de la TGasa (f1 = SEQ 1D N° 1; f2 = SEQ 1D N° 2), frente a un fago que no contiene ninguno de estos cDNA (f3), con respecto a la cantidad de proteína del ensayo. La actividad se mide en miliunidades (mU) de TGasa, por incorporación de biotincadaverina, como se describe en el apartado de metodología.

45 a = 40 mg proteína/ml. b = 60 mg prot/ml. c = 80 mg prot./ml.

Ejemplos de la invención

50 Ejemplo 1

Aislamiento y clonaje de dos cDNA que codifican para dos proteínas de la familia de transglutaminasas de maíz mediante inmunocribado

55 Banco de expresión

Los cDNA de la presente invención, fueron aislados a partir de un banco de expresión de cDNA, en Lambda-ZAP II®, construida con las dianas EcoRI y XhoI, partiendo de ARN mensajero de plántulas de dos semanas de edad de *Zea mays* subsp. *mays*, cultivar homocigoto B73, creciendo bajo condiciones de invernadero (donada por la Dra. Alice Barkan, de la Universidad de Oregon, USA).

Anticuerpo utilizado en el inmunocribado

65 Se utilizó como antígeno una transglutaminasa vegetal de 58 kDa purificada a partir de extractos de cloroplastos de hojas de *Helianthus tuberosus*. Se obtuvo un anticuerpo policlonal en gallina (Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. Protoplasma. 216:155-163). La especificidad del anticuerpo se determinó por la técnica de "dot blot", utilizando transglutaminasa comercial de hígado de cerdo, así como por western blot con proteína purificada

(Dondini, L. 1998. Poliammine legate e transglutaminasi nelle piante. PhD tesis. Universidad de Bologna. Italia). La titulación se realizó mediante la técnica de western blot. (La metodología completa se detalla en nuestro trabajo: Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. Protoplasma. 216:155-163).

Immunocribado del banco

Una vez conocido el título del banco utilizado, se inocula una colonia de la cepa XL-Blue® en medio LB líquido conteniendo MgSO₄ (1M) y maltosa al 20%.

Después de cultivar las bacterias hasta alcanzar una DO de 2,0 (600 nm), se realiza la mezcla del cultivo bacteriano con 4,5 x 10⁴ pfu de la librería, a la que se añade IPTG 10 mM. Después de la infección e inoculación en placas con el medio LB + 10 mM de MgSO₄, se coloca sobre ellas un disco de nitrocelulosa saturado con 10 mM de IPTG. Después de incubar las placas con el filtro durante 4 horas, se enfrían y se lava el filtro con PBS. Finalmente, una vez bloqueada la membrana con leche desnatada o BSA, se procede al revelado y marcado con anticuerpo. Para detectar las lisis donde se encuentran los fagos positivos que han de interactuar con el anticuerpo contra la Transglutaminasa de *H. tuberosus*, se realiza un análisis western blot de dicha membrana y se revela en placa fotográfica, mediante el reactivo ECL.

Excisión *in vivo* de los fagémidos en pBluescript SK- y selección de colonias positivas

Una vez aislados y purificados los dos fagos, que contienen los cDNAs que codifican respectivamente para una proteína que interactúa con el anticuerpo, se procede a su excisión mediante el sistema “ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage (Stratagene)”. La coinfección se realizó en cepas XL1-Blue y la infección en cepas XL0LR®. El plaqueo se realiza en un medio selectivo que determina el vector utilizado (pBluescript). En nuestro caso, el medio de cultivo que selecciona las colonias transformantes es LB-agar adicionado con Ampicilina (50 µg/ml), IPTG 1 mM y el sustrato X-Gal (40 µg/ml), del enzima β-galactosidasa, cuyo gen es interrumpido por el inserto o cDNA.

Aislamiento de plásmidos a pequeña escala (MINIPREP)

Para cada excisión, el aislamiento del ADN plasmídico, que contiene el cDNA de interés, se realiza mediante la técnica de MINIPREP a pequeña escala de la lisis bacteriana utilizando SDS y NaOH, neutralizada con acetato de potasio, y purificada con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamil-alcohol (25:24:1) y precipitando con etanol. Posteriormente se resuspende en Tampón TE 1X adicionado con el enzima ARNasa.

Comprobación de la presencia de cDNA en el vector pBluescript

En cada caso, la comprobación de la presencia del inserto en el pBluescript se realiza mediante digestiones de una muestra del ADN plasmídico, obtenido con las mismas enzimas endonucleasas con las que se construyó el banco (EcoRI y XhoI). La digestión se realiza según los requerimientos de cada enzima de restricción (Tampón y temperatura). Una vez realizada la digestión, el cDNA o inserto ha quedado liberado del vector. Esto se verifica con una electroforesis convencional en gel de agarosa 0.5% en Tampón TBE 1X o TAE 1X.

Secuenciación (Servicio de Secuenciación del IBMB, CSIC de Barcelona)

Una vez identificadas las muestras de las minipreparaciones que contienen los cDNA de interés, que resultaron ser dos en nuestro caso, se precipitan y purifican mediante el uso de la mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y cloroformo puro antes del proceso de secuenciación. Las muestras a secuenciar se disolvieron en agua.

Determinación de la secuencia codificante completa mediante la técnica de RACE

Las excisiones de los dos fagos en pBluescript SK-, permitieron obtener dos cDNA parciales cuya secuencia codificante completa se definió mediante la técnica de RACE. Para ello, a partir de ARN total extraído de hoja de maíz, se obtiene el ARN mensajero purificado por columna de polydT, el cual se emplea como molde para la síntesis de ADN de cadena sencilla. Para ello, se utiliza un oligonucleótido específico deducido de la secuencia de cDNA conocida (el oligo E1, 3'-5': GATTCTCCCTGATAAG, SEQ ID NO 5) y el enzima transcriptasa inversa. Después de añadir al ADN de cadena sencilla una cola de poliT mediante el enzima “terminal deoxytransferase” (TdT), se procede a obtener la segunda cadena de ADN. Esto se realiza mediante la técnica de PCR utilizando el oligonucleótido 5' RACE Abridged Anchor Primer (GIBCO BRL®), específico para ADN con cola de poliT (oligo ANCHOR 5'-3': GGCCAGGCGTC GACTAGTACGGGIIIGGGIIIG, SEQ ID NO 6) y un segundo oligonucleótido específico del cDNA parcial de secuencia conocida, detallado anteriormente, y que corresponde al oligo E2 3'-5': GTTCTCCAGCATCTCCAG, SEQ ID NO 7).

Con los subsiguientes ciclos de PCR se amplifica dicho ADN. La secuencia de los ciclos fue la siguiente: primero 2 minutos a 94°C y seguidamente 34 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 46°C para el oligo nº 1, pero 30 segundos a 60°C para el oligo nº 2, seguidos en ambos casos de 7 minutos a 72°C. Finalmente se deja unas horas a 5°C.

El producto de PCR se clona en un vector adecuado (como es el pGEMT), utilizando el enzima ligasa. A continuación, se transforman cepas de *E. coli* del tipo DH5-alfa y se crecen las bacterias en un medio selectivo. Se extrae el ADN plasmídico mediante la técnica de Miniprep, ya descrita, se purifica y se secuencian los fragmentos obtenidos. En nuestro caso, para ambas secuencias parciales de cDNA, el fragmento necesario para completar la secuencia codificante resultó ser de solo cuatro nucleótidos. Las secuencias codificantes completas de nucleótidos, incluyendo los cuatro nucleótidos obtenidos con la técnica RACE, se encuentran descritas en la SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, respectivamente. Los vectores de expresión conteniendo las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3 y utilizados para la transformación de las células huésped son el plásmido pGEMT15 y el pGEMT21, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de las secuencias de nucleótidos presentan homologías con los dominios del centro activo tipo transglutaminasa de otros sistemas descritos, no vegetales, en la zona correspondiente a los aminoácidos: 431-474 para la proteína de SEQ ID NO 2 (60,97 kDa) y 485-528 para la proteína de SEQ ID NO 4 (67 kDa). En estas zonas se encuentra en ambos casos una cisteína (Cys) descrita como aminoácido esencial para la actividad del enzima (Cys439 en SEQ ID NO 2 y Cys493 en SEQ ID NO 4). Base de Datos consultada: www.ncbi.nlm.nih/. Además, como se indican en las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3 se observan unas regiones de 27 nucleótidos repetidas en tandem en ambas secuencias, SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, aunque en número distinto, de 15 y 21 repeticiones, respectivamente y con pequeñas variaciones de nucleótidos entre algunas de ellas. Hay que destacar que estas mencionadas regiones repetidas no se han descrito anteriormente en las TGAsas conocidas, por lo que son características de la molécula de ADN de la presente invención.

Ejemplo 2

Comprobación de la actividad transglutaminasa de las proteínas expresadas por dichos cDNA

Determinación de la actividad TGasa de la proteína expresada por el cDNA

Con cada uno de los dos clones de los fagos conteniendo los cDNA de interés, se infecta un cultivo de *E. coli* (cepa XL-Blue), en medio de cultivo LB líquido, al que se añade IPTG 10 mM. Después de la lisis a 37°C, se cuantifica por el método de Lowry la concentración de proteína total del extracto (Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr, AL & Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275) y con él se realizan los ensayos descritos a continuación, para determinar su actividad transglutaminasa frente a un extracto de lisis con un fago que no contiene el cDNA de interés.

1.- Método de detección de actividad TGasa mediante determinación de las proteínas marcadas con putrescina tritiada

Se prepara un extracto enzimático con cada uno de los extractos de lisis obtenidos con ambos fagos (f1 que contiene la TGasa de SEQ ID NO 2 y f2 que contiene la TGasa de SEQ ID NO 4), en una concentración de proteínas totales de 600 µg, y se realiza un ensayo enzimático a 30°C durante 30 minutos. La mezcla enzimática contiene, además del extracto proteico, 0,6 mM de putrescina, 185 kBq de putrescina tritiada (0,85 TBq/nmol), 20 mM de tampón Tris.ClH pH 8 y 3 mM de CaCl₂. La reacción se bloquea con ácido tricloroacético al 10% conteniendo 2 mM de putrescina. Las muestras se precipitan repetidamente y se mide la radioactividad del pellet (Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Santos, M.A., Serafini-Fracassini, D. & Torné, J.M^a. 1999). Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplast. Plant Physiol Biochem. 37(12):899-909). La actividad TGasa se mide en pmols de putrescina por miligramo de proteína y por hora y fue mayor en los extractos proteicos obtenidos de los fagos f1 y f2 con respecto al extracto a partir de un fago que no contiene ninguno de los cDNA de estas TGAsas.

2. Método de detección de la actividad TGasa mediante ensayo tipo Elisa, utilizando CBZ-Gln-Gly como primer sustrato y biotincadaverina como segundo

Este ensayo consiste en un kit suministrado por la empresa Covalab[®], que determina, a partir de pequeñas cantidades de proteína total, la actividad TGasa de la muestra, frente a la de una TGasa comercial de hígado de cerdo. El método detecta los glutamyl-derivados formados a partir del péptido y de la poliamina sustrato, por actividad TGasa de la muestra, mediante un ensayo colorimétrico. La actividad se mide en Unidades de TGasa (U), considerando que 0,6 mU de TGasa comercial corresponde a un valor de absorbancia a 450 nm de 1 ± 0,05 OD.

Los dos extractos proteicos correspondientes a los dos productos de lisis, muestran actividad tipo TGasa en los dos métodos de detección de dicha actividad utilizados y descritos anteriormente (f1 y f2) en comparación con el extracto proveniente de un fago que no contiene ninguno de estos cDNA (f3). Los datos se muestran en las Figuras 1 y 2.

Además, en la Figura 1 se muestra el efecto de distintos factores sobre la actividad TGasa de los extractos, descritos como propios de dicha actividad enzimática TGasa en otros sistemas. Así, la actividad de la proteína expresada disminuye significativamente: a) en ausencia de calcio, b) en presencia de 1 mM de GTP, c) en presencia de 1 mM denodansilcadaverina (MDC) y d) en el extracto de lisis con un fago que no posee el cDNA de interés (f3).

ES 2 286 430 T3

Un par cultivos de la bacteria derivada de *Escherichia coli*, tipo dH5 α , transformadas con un plásmido (pBlueS-cript) que contiene un cDNA de maíz y portadoras de un plásmido que contiene el gen que codifica la proteína de secuencia SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4 de maíz respectivamente, identificados como 15TGZM02 y 21TGZM02, han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia, España, el 7 de Mayo de 2002, correspondiéndoles el número de depósito CECT: 5705 para 15TGZM02 y 5706 para 21TGZM02, respectivamente.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad TGasa **caracterizada** porque proviene del maíz.

2. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 **caracterizada** por la SEQ ID NO 1.

3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 **caracterizada** por la SEQ ID NO 3.

4. Secuencia de nucleótidos **caracterizada** porque presenta, con respecto a una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.y porque codifica una proteína con actividad Tgasa.

5. Vector de expresión **caracterizado** porque contiene una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4.

6. Vector de expresión según la reivindicación 5 **caracterizado** porque pertenece, entre otros, al siguiente grupo: plásmido pGEMT15 y el pGEMT21.

7. Proteína con actividad TGasa **caracterizada** porque está codificada por una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4.

8. Proteína con actividad TGasa según la reivindicación 7 **caracterizada** porque pertenece, entre otras, al siguiente grupo: SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4.

9. Célula transformada **caracterizada** porque contiene un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 y porque permite la expresión de proteínas con actividad TGasa, entre otras, las cepas *E. coli* CECT 5705 y 5706.

10. Uso de la célula transformada según la reivindicación 9 en procedimientos para la producción de proteína recombinante con actividad TGasa según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8.

11. Uso de la proteína con actividad TGasa según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 en la manipulación, procesamiento y transformación de alimentos, entre otros procesos, para mantener o mejorar la textura, consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de alimentos como pescado, queso, yogures, helados, mayonesas y carnes, para la formulación de gelatinas de distinta densidad y para preparar cocinados con menos grasas.

12. Uso de los vectores de expresión según las reivindicaciones 5 y 6 en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades provocadas por la manipulación de las funciones atribuidas a dicha TGasa, entre otras, crecimiento y desarrollo de la planta, morfogénesis, fotosíntesis y muerte celular.

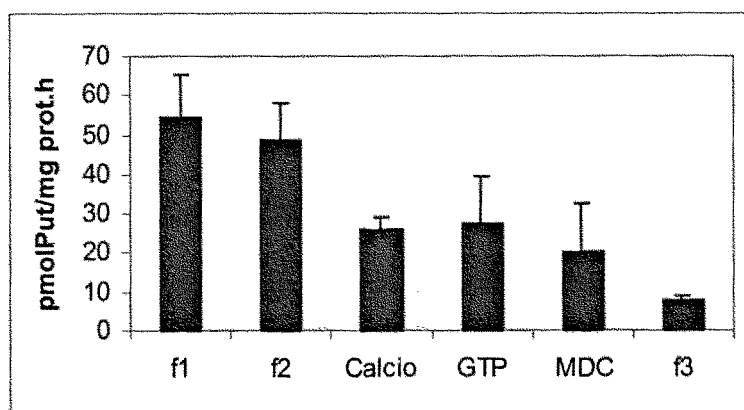


Figura 1

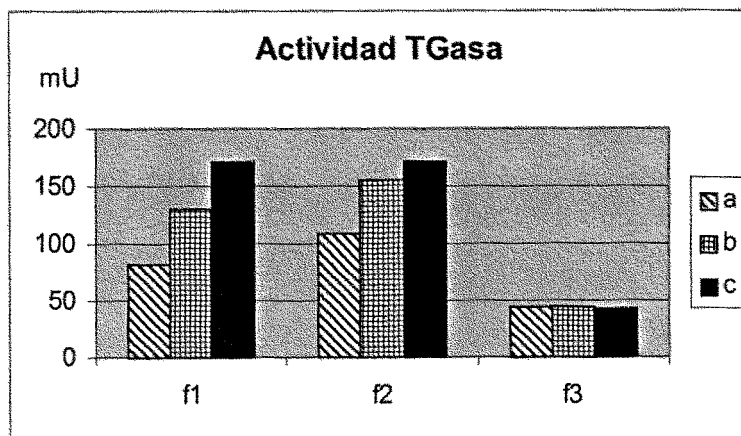


Figura 2